

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
в корзину
предыдущий
следующий

Предыдущий документ			
Реферат	Описание	Формула	Рисунок

Статус	действует (по данным на 17.06.2004)
(11) Номер публикации	2196602
(13) Вид документа	C1
(14) Дата публикации	2003.01.20 <input type="button" value="Поиск"/>
(19) Страна публикации	RU
(21) Регистрационный номер заявки	2002101294/14
(22) Дата подачи заявки	2002.01.22
(24) Дата начала действия патента	2002.01.22
(46) Дата публикации формулы изобретения	2003.01.20 <input type="button" value="Поиск"/>
(516) Номер редакции МПК	7
(51) Основной индекс МПК	A61K38/05 <input type="button" value="Поиск"/> <input type="button" value="МПК"/>
(51) Основной индекс МПК	A61K38/55 <input type="button" value="Поиск"/> <input type="button" value="МПК"/>
Название	СРЕДСТВО ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ВИЧ И ЦМВ-ИНФЕКЦИЙ И СПОСОБ ИХ ИНГИБИРОВАНИЯ
(56) Аналоги изобретения	RU 2129436 С1, 27.04.1999. RU 2124022 С1, 27.12.1998. US 5811460 A, 22.09.1998.
(71) Имя заявителя	Закрытое акционерное общество "Деско" <input type="button" value="Поиск"/>
(72) Имя изобретателя	Миллер Г.Г. <input type="button" value="Поиск"/>
(72) Имя изобретателя	Кущ А.А. <input type="button" value="Поиск"/>
(72) Имя изобретателя	Романова В.С. <input type="button" value="Поиск"/>
(73) Имя патентообладателя	Закрытое акционерное общество "Деско" <input type="button" value="Поиск"/>
(98) Адрес для переписки	603000, г.Нижний Новгород, ул. Костина, 4, оф.310, ЗАО "Деско", Директору Л.Д. Раснецовой

Реферат	Описание	Формула	Рисунок
---------	----------	---------	---------

Предыдущий документ			
---------------------	--	--	--

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
ДОКУМЕНТ
Печатая страницы
в конец
в корзину
печатать

Предыдущий документ

Библиография

Реферат

Формула

Рисунок

№2196602. Описание

Изобретение относится к медицине, в частности к этиотропной химиотерапии вирусных инфекций, в частности к применению аминокислотных и дипептидных производных фуллерена в качестве средств ингибирования репродукции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и цитомегаловируса (ЦМВ) человека в клеточных культурах *in vitro* и может быть использовано в терапии заболеваний, вызываемых этими вирусами.

До настоящего времени не существует абсолютно эффективных средств и методов ингибирования с использованием химиопрепаратов, вакцин и других средств, способных привести к излечению от ВИЧ-инфекции и СПИДа. Трудно поддается лечению и ЦМВ-инфекция. При СПИДе она сопровождает основное заболевание в качестве наиболее распространенного оппортуниста. Большинство химиопрепаратов для ингибирования ВИЧ и ЦМВ требуют применения высоких доз в течение длительного периода времени и, как правило, являются высоко токсичными. Наиболее распространенной для ингибирования является группа аналогов нуклеозидов, таких как AZT, DDI и DDC, блокирующая процесс обратной транскрипции в геноме клеток, инфицированных ВИЧ. Недостатком известной группы аналогов нуклеозидов и способа ингибирования является необходимость начального фосфорилирования клеточными ферментами для их активации. Кроме того, серьезным препятствием для нуклеозидной терапии является быстро развивающаяся у больных резистентность к этим препаратам и их

высокая токсичность.

В последнее время в качестве мишени для ингибиования при лечении и профилактике ВИЧ наибольшее внимание привлекает вирусная протеаза (ПВИЧ), представляющая собой димер с молекулярным весом около 10 kD. Активный центр фермента образуют две аминокислоты Asp₂₅ и Asp₁₂₅. ПВИЧ специфически расщепляет предшественники полипротеинов (Gag - pol), ответственных за синтез структурных белков и энзимов ВИЧ. Поэтому эффективная блокада активности ПВИЧ, предотвращающая формирование инфекционного вируса, снимает тяжесть инфекции в организме. Однако, поскольку ДНК-провирус ВИЧ интегрирован с клеточным геномом, постоянно остается возможность продукции инфекционного вируса в результате активации процесса обратной транскрипции с помощью критического для репликации ВИЧ энзима - обратной транскриптазы (ОТ).

В настоящее время существует представление о необходимости использования комплексного ингибиования ВИЧ-инфекции с одновременным применением как ингибиторов ОТ [нуклеозидных аналогов (NRTI) и не нуклеозидных ингибиторов (NNRTI)] , так и химических ингибиторов протеазы - саквинавира, индинавира, ритонавира и нелсинавира (S.G. Deeks, M. Smith, M. Holodniy et al., JAMA, 1977, v. 277, 12, p. 145-153; Ch. Carpenter, M. Fischl, S. Hammer et al., JAMA, 1997, v.277, N.24, p. 1962; P. Lorenzi, V. Masserei, B. Laubereau et al., "12th World AIDS Conf. Geneva", 1998, abstr. 32453, p. 27).

Недостатком комплексного ингибиования является значительное снижение эффективности из-за возникающих осложнений в результате чрезмерной нагрузки организма больного высокими дозами трех, четырех и более препаратов, одновременно и длительно

употребляемых пациентом. Необходимость дополнения терапевтического курса препаратами, подавляющими активность возбудителей сопутствующих инфекций, прежде всего таких, как ЦМВ, еще больше осложняет лечебный процесс. Дополнительным препятствием для любого вида терапии является достаточно быстрое развитие резистентности к химическим препаратам у пациентов из-за высокой скорости мутагенных процессов, происходящих в структуре вирусного генома и продуктах генов.

Наиболее близким к изобретению является соединение, содержащее водорастворимое производное фуллерена с общей формулой $C_{60}-X = HOC(O)(CH_2)_2C(O)NH(CH_2)_2$ (публ. WO 95/19949, С-07 С 49/223, 1995), и способ его использования, заключающийся в воздействии фармацевтически эффективным количеством этого соединения на инфицированные клетки *in vitro*. Известное соединение представляет собой производное метанофуллерена. Благодаря точной стерической и химической комплементарности молекулы C_{60} и активной области ПВИЧ между ними в процессе взаимодействия формируется комплекс по типу лиганд - белок. Поскольку C_{60} и его производные являются, в основном, гидрофобными соединениями, между производными C_{60} и активной областью ПВИЧ происходит сильное гидрофобное взаимодействие, достаточное для ингибирования активности ПВИЧ. Для разных производных фуллерена связь лиганд - белок составляет 7-11 ккал/моль. Полярные радикалы обеспечивают водорастворимость соединениям фуллерена за счет солюбилизации. В качестве заместителей могут быть использованы любые алкиловые или арил-алкиловые заместители, имеющие в своем составе азот или кислород и содержащие от 1 до 20 атомов углерода. Эффективная терапевтическая доза (FD₅₀) для острой инфицированных РИЧ-1

первичных лимфоцитов периферической крови человека (ЛПК) составляет $7,3 \pm 5,9$ мкМ, хронически инфицированных клеток Н9 - $10,8 \pm 8,2$ мкМ. Известный ингибитор также оказывает действие на рекомбинантную ОТ ВИЧ-1 p66/51, ингибирующая доза (ID_{50}) которого равна $4,6 \pm 0,92$ мкМ.

Недостатком известного соединения и способа его использования является недостаточная ингибирующая активность - отношение константы Михаэлиса к константе ингибирования ($K_m = 15,9$ мкМ, $K_i = 5,3$ мкМ) и, как следствие, использование высоких доз для достижения эффекта ингибирования.

Задача, на решение которой направлено изобретение, заключается в создании средств на основе аминокислотных и дипептидных производных фуллерена и способа их использования для ингибирования репродукции ВИЧ (по механизму блокирования ферментов ПВИЧ и ОТ) и одновременного ингибирования ЦМВ-инфекции (по механизму подавления синтеза поздних структурных белков вириона).

Указанный результат достигается применением аминокислотных или дипептидных производных фуллерена общей формулы $C_{60}-X$, где C_{60} - фуллереновое ядро, $X=NH-CHR-COOH$, $NH-(CH_2)_nCOOH$, $NH-CHR-CO-NH-CHR-COOH$;

$n=$ от 2 до 6;

R - боковой радикал природной аминокислоты или дипептида, в качестве средства для ингибирования вирусных инфекций, в частности ВИЧ и ЦМВ-инфекций.

Указанный результат достигается также способом использования аминокислотных или дипептидных производных фуллерена общей формулы C_{60} -X в качестве средства для ингибирования вирусных инфекций, заключающимся в его воздействии на инфицированные клеточные культуры *in vitro* эффективной ингибирующей дозой.

Указанное ингибирование осуществляют в отношении вирусов семейства Lentiviridae и семейства Herpesviridae одновременно. В качестве вируса семейства Lentiviridae используется вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), в частности, для остро инфицированных клеток используется штамм HIV-899 (Gelderloom, 1994), а для хронически инфицированных клеток используется штамм НТHIV27 (Г.Г. Миллер, 1994).

В качестве вируса семейства Herpesviridae используется цитомегаловирус человека, в качестве которого, в частности, используется референс штамм AD169. При этом воздействие на ВИЧ-1 осуществляют по механизму ингибирования протеазы и обратной транскриптазы, воздействие на ЦМВ человека осуществляют по механизму ингибирования поздних структурных белков. В качестве аминокислотного производного фуллерена используется C_{60} -6-аминокапроновая кислота или ее натриевая соль (C_{60} -АКК) либо C_{60} -4-аминомасляная кислота или ее натриевая соль (C_{60} -АМК).

Указанный результат достигается также тем, что средства для ингибирования не обладают цитотоксичностью до 1500 мкг/мл и имеют индекс селективности (SI) в пределах 267-2500.

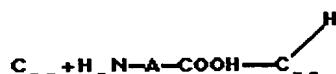
Средство для ингибирования (C_{60} -АКК) оказывает 50% подавление пролиферации первичных лимфоцитов и быстро делящихся клеток при

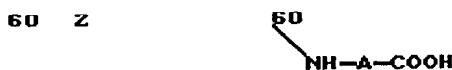
концентрации 720 - 830 мкг/мл. Его эффективные ингибирующие дозы (ED_{50}) составляют для остро ВИЧ-инфицированных клеток 0,4-0,6 мкМ, для хронически ВИЧ-инфицированных клеток - 8,4-12,6 мкМ, для ЦМВ-инфицированных клеток - 2,16-3,24 мкМ. Ингибирующая доза для оказания вирулицидного действия в отношении ВИЧ составляет 0,8-1,2 мкМ, в отношении ЦМВ - 8,4-12,6 мкМ. Ингибирующая доза (ID_{50}) на активность изолированной протеазы ВИЧ составляет 2,3-2,9 мкМ, рекомбинантной обратной транскриптазы - 5,6-6,8 мкМ.

Средство для ингибирования (C_{60} -АМК) оказывает 50% подавление пролиферации первичных лимфоцитов и быстро делящихся клеток при концентрации 550-600 мкг/мл. Его эффективная ингибирующая доза для остро ВИЧ-инфицированных клеток составляет 8-12 мкМ, для ЦМВ-инфицированных клеток - 0,48-0,72 мкМ. Ингибирующая доза (ID_{50}) на активность изолированной протеазы ВИЧ составляет $(3,19-3,89) \cdot 10^{-8}$ М при константе ингибирования $1,4 \cdot 10^{-8}$ М.

Предлагаемое изобретение относится к применению описанных ранее соединений - фуллереновых производных аминокислот или дипептидов общей формулы I, которые известны как стимуляторы иммунного ответа - адьюванты (см. патент РФ 2129436), в качестве средств для ингибирования ВИЧ и ЦМВ-инфекций и способу их использования.

Фуллереновые производные аминокислот и дипептидов общей формулы I представляют собой новый класс соединений и относятся к группе нетоксичных субстанций, обладающих высокой биодоступностью.





Соединения получают одностадийным синтезом путем непосредственного присоединения остатков аминокислот или дипептидов к фуллереновому ядру. Для этого к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле добавляют водный раствор натриевой или калиевой соли аминокислоты (в частности, аминокапроновой, аминомасляной и др.) и 18-краун-6. Реакционную массу перемешивают 6-8 часов при 60°C. Затем растворители отгоняют, остаток фуллеренового производного обрабатывают насыщенным раствором KCl, после чего остаток фуллеренового производного промывают водой. Выход количественный. Полученное в виде твердого порошкообразного вещества N-(моногидро)-фуллерениламинокислотное производное растворимо в диметилсульфоксида, диметилформамиде, пиридине и воде. Более детально способ получения описан в патентах РФ 2124022, 2129436. Использование в процессе синтеза натриевых солей аминокислот позволяет получить производное фуллерена с растворимостью в воде 20-30 мг/мл в отличие от средства-прототипа с растворимостью в воде около 1 мг/мл.

Сущность предложенного изобретения заключается в том, что у известного соединения общей формулы I были обнаружены новые свойства, а именно способность оказывать ингибирующее воздействие на ВИЧ и ЦМВ одновременно. Причем в противоположность монотерапевтическим препаратам соединение позволяет одновременно ингибировать цитопатогенность ВИЧ по двум мишениям (ПВИЧ и ОТ), а также блокировать синтез поздних структурных белков ЦМВ (в частности, белка gB) - одного из главных оппортунистов ВИЧ-инфекции. Указанное соединение наряду с фуллереновым ядром C₆₀,

обеспечивающим гидрофильно-гидрофобный баланс молекулы, содержит водорастворимые радикалы - амино- и карбоксильные группы, благодаря которым соединение имеет растворимость выше, чем метанофуллерены по способу-прототипу.

Для определения противовирусной активности было синтезировано восемь соединений, производных фуллерена и аминокислоты:

C_{60} -6-aminocapronic acid, Na salt, (растворимость 30 мг/мл);

C_{60} -4-aminooil acid, Na salt, (растворимость 30 мг/мл);

C_{60} -DL-serine, Na salt, (растворимость до 20 мг/мл);

C_{60} -L-proline, Na salt, (растворимость до 2,0 мг/мл);

C_{60} -L-alanine, Na salt, (растворимость до 1,5 мг/мл);

C_{60} -L-lysine, Na salt, (растворимость до 1,5 мг/мл);

C_{60} -L-arginine, Na salt, (растворимость до 20 мг/мл);

C_{60} -glicine, Na salt, (растворимость до 20 мг/мл).

Кроме того, были получены водорастворимые дипептидные производные фуллерена следующих составов:

C_{60} -glicil -L asparagine, Na salt, (растворимость до 1,5 мг/мл);

C_{60} -DL-alanil-DL-alanine, Na salt, (растворимость до 1,5 мг/мл);

C_{60} -L-alanil-L-alanine, Na salt, (растворимость до 1,5 мг/мл).

Водорастворимые производные фуллерена показали различную

противовирусную активность в отношении RIN-1 и IMR. Результаты по

противовирусную активность в отношении ВИЧ-1 и ЦМВ. Результаты по определению анти-ВИЧ-1 и анти-ЦМВ активности препаратов - аминокислотных и дипептидных производных фуллерена - приведены в таблице.

Наиболее эффективными оказались два соединения: натриевая соль C_{60} -6-аминокапроновой кислоты и натриевая соль C_{60} -4-аминомасляной кислоты.

Оценку антивирусной активности и изучение фармакологических свойств соединения I осуществляли в чувствительных клеточных культурах *in vitro* поэтапно.

На первом этапе определяют острую и хроническую цитотоксичность и пролиферативную активность незараженных клеток, обработанных возрастающими концентрациями тестируемых субстанций.

На втором этапе проводят тестирование субстанций в остро и хронически инфицированных чувствительных клеточных культурах и первичных лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* для определения ингибирующей дозы.

На третьем этапе изучают механизм ингибирующего эффекта при взаимодействии I с изолированными вирусными энзимами (ПВИЧ и ОТ) и определяют уровень синтеза вирусспецифических белков для ЦМВ с использованием моноклональных антител (МАТ) к позднему структурному белку (см. таблицу).

Первый этап.

1. Определение цитотоксичности соединений C_{60} -АКК и C_{60} -АМК.

Токсические свойства соединений изучают на клетках, чувствительных к ВИЧ и ЦМВ, а именно: лимфоцитах периферической крови человека (ЛПК), Т-лимфобластоидных клетках МТ4, диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Жизнеспособность клеток, обработанных возрастающими концентрациями C_{60} -АКК и C_{60} -АМК, определяют по исключению витального красителя трипанового синего. После инкубации при температуре 37°C в атмосфере 4,7% CO_2 в течение 4-5 дней клетки окрашивают трипановым синим и просчитывают в камере Горяева. Живые пролиферирующие клетки остаются неокрашенными, в то время как погибшие в результате токсического действия субстанции, окрашиваются в ярко-синий цвет.

Результаты тестирования показывают, что субстанции не обладают цитотоксичностью до 160-1500 мкг/мл по данным разных тестов.

2. Определение антипролиферативной активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК.

Антипролиферативное действие соединений изучают на тех же типах клеток по мониторингу клеточного метаболизма в течение 18-20 часов с применением радиоактивной метки. Во все клетки, размещенные в 96-луночные планшеты, вносили тестируемые соединения в концентрациях от 100 до 1000 мкМ и инкубировали 72 часа, после чего вводили 3H -тимидин ($H-TD$) в концентрации 2-5 μ kCi/мл. Включение ^3H-TD в обработанные и необработанные клетки просчитывали с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика Ultrabetta-1210 фирмы LKB.

При подсчете радиоактивной метки было выявлено, что 50% подавление пролиферации первичных лимфоцитов и быстро делящихся клеток происходит при концентрации 720 - 830 мкг/мл для C_{60} -АКК и 550 - 600 мкг/мл для C_{60} -АМК. Индекс селективности субстанции неизвестен в пределах 267-2500 и существенно отсутствует.

субстанции находился в пределах 201-2000 и существенно отличался от индекса селективности ганцикловира (100-1000) - специфического ингибитора ЦМВ и от индекса селективности AZT (1000) - специфического ингибитора ОТ ВИЧ.

Второй этап.

1. Определение вирус-ингибирующей активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в культурах клеток *in vitro*.

Ингибирующая активность C_{60} -АКК и C_{60} -АМК определялась как дозозависимая величина, выраженная в виде концентрации вещества, необходимой для ингибирования репродукции вируса на 50%.

В процессе анализа использовались следующие методы регистрации ингибирующей активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК:

- метод иммуноферментного анализа (ИФА) для измерения уровня продукции p24 gag антигена ВИЧ;
- метод непрямой иммунофлуоресценции (НИФ) для измерения доли ВИЧ антиген-содержащих клеток после обработки возрастающими концентрациями действующей субстанции;
- метод иммуноцитохимического анализа вирусных белков ЦМВ с использованием моноклональных антител (мАТ) к позднему структурному белку gB и сверхраннему белку IE p72.

Редукцию p24 антигена измеряли в остро и хронически инфицированных клетках MT4 с использованием коммерческой ИФА тест-системы Vironostika (Голландия) в 96-луночных планшетах.

Результаты оценивали по изменению оптической плотности (ОП) при

длине волны 450 нм на мультискане (Labsystems Multiskan PLUS, Финляндия) (см. график).

а) Измерение вирус-ингибирующей активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в остро ВИЧ-инфицированных клетках.

Возрастающие концентрации тестируемой субстанции, способной ингибировать продукцию внутриклеточного вируса, инкубировали с остро инфицированными клетками МТ4 или ЛПК при множественности инфекции примерно 100 ТДЦ₅₀/мл штамм ВИЧ 899.

Эффективная доза для C_{60} -АКК составила $0,49 \pm 0,1$ мкМ, для C_{60} -АМК $10 \pm 2,0$ мкМ.

Значения концентраций C_{60} -АКК и C_{60} -АМК для редукции суммарных антигенов ВИЧ в остро инфицированных клетках, измеренные методом НИФ и рассчитанные методом логарифмической интерполяции также составили $0,5 \pm 0,1$ мкМ и 10 ± 2 мкМ соответственно. Следовательно, двумя различными тестами были получены одинаковые значения концентраций для ингибирования инфекционности ВИЧ.

б) Измерение вирус-ингибирующей активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в клетках, хронически инфицированных ВИЧ.

Хронически инфицированные клетки (штамм НТНIV'27) были использованы для подсчета ингибирующей активности тестируемых субстанций, которые действуют на пост-интеграционные процессы, такие как экспрессия генов и освобождение вируса из клеток.

В конических пробирках типа Eppendorf емкостью 1,5 мл размещали по $5 \cdot 10^5$ клеток на мл, центрифугировали при 900-1000 об/мин и дважды отмывали бессывороточной средой от вируса, освобожденного из

клеток. Супернатанты удаляли, в клетки вносили возрастающие концентрации C_{60} -АКК и C_{60} -АМК и инкубировали 2 часа при 37°C. После удаления растворов, ингибитора клетки размещали в 24-луночные планшеты Nunc и добавляли по 1 мл питательной среды RPMI 1640 с 10% телячьей сыворотки в каждую лунку. После 5 суток культивирования отбирали из контрольной и обработанной лунок по 100 мкл культуральной жидкости и определяли продукцию p24 антигена, как описано выше. Результаты анализа показали, что эффективная доза для C_{60} -АКК составляет $10,5 \pm 2,1$ мкМ, что примерно в 20 раз выше, чем для остро инфицированных клеток.

в) Измерение вирус-ингибирующей активности C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в ЦМВ-инфицированных клетках.

Тестирование проводили на ФЛЭЧ (штамм получен из госколлекции клеточных культур института цитологии РАН, Санкт-Петербург) с использованием референс штамма ЦМВ - AD169. Клетки, инфицированные примерно 0,001 БОЕ/кл ЦМВ, размещали во флаконах Nunc емкостью 25 мл, в 10 мл питательной среды и инкубировали с возрастающими концентрациями C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в течение 21 дня. Иммуноцитохимический анализ вирусных белков в зараженных клетках показал, что тестируемые субстанции эффективно подавляют цитопатогенное действие ЦМВ за счет ингибирования синтеза позднего структурного белка gB, но не влияют на экспрессию сверхраннего неструктурного белка IE p72 (для C_{60} -АКК), тогда как C_{60} -АМК подавляет синтез как поздних, так и ранних белков ЦМВ. Молекулярный механизм действия этой субстанции на ЦМВ-инфекцию *in vitro* пока не изучен.

Эффективные ингибирующие дозы, рассчитанные методом

логарифмической интерполяции, составили для C_{60} -АКК $2,7 \pm 0,54$ мкМ, для C_{60} -АМК- $0,6 \pm 0,12$ мкМ.

2. Определение вирулицидного действия C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в отношении ВИЧ и ЦМВ.

Примерно 100 ТЦД₅₀/мл ВИЧ и 0,001 БОЕ/кл ЦМВ инкубировали с возрастающими концентрациями C_{60} -АКК и C_{60} -АМК в течение 2 часов при температуре 37°С. Взвеси центрифугировали при 40 000 об/мин в течение 30 минут при 4°С. Супернатанты удаляли, вирусные осадки ресуспенсировали в свежей питательной среде и инфицировали ими ЛПК и ФЛЭЧ, размещенные во флаконах Nunc емкостью 25 мл, в 10 мл питательной среды. Через 5-6 суток для ВИЧ и через 21 день для ЦМВ остаточный вирус анализировали методом НИФ и иммуноцитохимическим методом соответственно.

Вирулицидное действие C_{60} -АКК в отношении ВИЧ оказывает в концентрации $1,0 \pm 0,2$ мкМ, в отношении ЦМВ - $10,5 \pm 2,1$ мкМ; C_{60} -АМК в отношении ВИЧ оказывает в концентрации $18,5 \pm 3,5$ мкМ, в отношении ЦМВ - $1,5 \pm 0,3$ мкМ.

Третий этап.

1. Определение вирус-ингибирующего эффекта C_{60} -АКК и C_{60} -АМК на активность изолированной протеазы ВИЧ (ПВИЧ).

Определение ингибирующего эффекта тестируемых субстанций против изолированной протеазы проводилось для изучения механизма ингибирования. При этом использовали концентрацию ингибитора, снижающую скорость ферментативной реакции вдвое - ID₅₀. В качестве изолированной ПВИЧ применяли круд экстракт ПВИЧ, полученный генноинженерным путем в *Escherichia coli*. Исследование

ферментативной реакции проводили при $(0,1-0,3)\cdot10^{-3}$ М субстрата и $2,7\cdot10^{-8}$ М протеазы ВИЧ-1 без ингибитора и в его присутствии.

Для характеристики типа ингибиования определили константу ингибиования (K_i), которая составила для C_{60} -АКК $1,52\cdot10^{-6}$ М при концентрации ингибитора $3,125\cdot10^{-6}$ М, что указывает на конкурентный тип ингибиования и высокую аффинность комплекса ингибитор - вирусный энзим. Определение ингибирующего эффекта ПВИЧ проводили на основе спектрофотометрического измерения поглощения по оптической плотности (ОП) на длине волны 599 нм при гидролизе пептида Lys-Ala-Arg-Val-Nle-Nph-Glu-Ala-Nle-NH₂. Так как данное ингибиование относится к конкурентному типу, то для расчета ID_{50} использовали формулу

$$ID_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right),$$

где $S=0,15\cdot10^{-3}$ М - концентрация субстрата;

$K_m=205\cdot10^{-6}$ М - константа Михаэлиса-Ментена.

Ингибирующая доза для C_{60} -АКК составила $(2,6\pm0,3)\cdot10^{-6}$ М.

Определение ингибирующего эффекта C_{60} -АМК на ПВИЧ оценивали спектрофотометрически по измерению поглощения при гидролизе пептида Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Nph-Glu-Ala-Met. Константа Михаэлиса-Ментена для C_{60} -АМК составила $98\cdot10^{-6}$ М, константа ингибиования - $1,4\cdot10^{-8}$ М. Ингибирующая доза, рассчитанная по вышеприведенной формуле, составила $(3,54\pm0,35)\cdot10^{-8}$ М.

Соединения C_{60} -АКК и C_{60} -АМК при той же концентрации $3,125$ мкМ не показали активности против пепсина в концентрации 0,032 мМ, подтверждая, таким образом, специфичность действия выбранного ингибитора на протеазу ВИЧ

ингибитора на протяжении 1 ч.

2. Определение вирус-ингибирующего эффекта C_{60} -АКК на активность рекомбинантной обратной транскриптазы ВИЧ (ОТ ВИЧ).

Ингибирующий эффект соединения C_{60} -АКК на активность рекомбинантной ОТ ВИЧ (р65/51) определяли с использованием праймеров oligo (dT)₁₂₋₁₈ poli(rA)_n. Субстанция C_{60} -АКК показала эффективность при ID₅₀, равной (6,2±0,6)·10⁻⁶ М. Это значение находится в промежуточном интервале между значениями ID₅₀ для остро- и хронически инфицированных клеток и в 62 раза выше значений селективного позитивного контроля AZT (0,1 мкМ).

Субстанция не показала селективной активности и цитотоксического эффекта против клеточной ДНК-альфа полимеразы.

3. Определение уровня синтеза вирусспецифических белков для ЦМВ с помощью моноклональных антител к позднему структурному белку gB.

Ингибиция позднего структурного белка gB под действием C_{60} -АКК осуществляется аналогично тому, как это описано для специфичного ингибитора ЦМВ - ганцикловира (K. K. Biron et al., 1985). Что касается C_{60} -АМК, то механизм ингибиции сверхранних и поздних белков ЦМВ в настоящее время не изучен.

Показатели - эффективные фармацевтические дозы, представлены как средние значения из трех проведенных экспериментов. Коэффициент корреляции составлял более 0,96. Отступление от средних показателей составило менее 20%.

Таким образом, воздействие фармацевтически эффективным количеством водорастворимых аминокислотных или дипептидных

производных фуллерена общей формулы C_{60} -X позволяет осуществлять одновременное ингибирование ВИЧ и ЦМВ - инфекций в клеточных культурах *in vitro*. Потеря инфекционности осуществляется путем связывания указанной субстанции с активным сайтом молекулы ПВИЧ и/или ингибирования ОТ ВИЧ, а также блокирования синтеза позднего структурного белка ЦМВ - gB. Субстанции C_{60} -X могут применяться для лечения и профилактики СПИДа, а также ЦМВ - инфекций, так как они обладают эффективными противовирусными свойствами, являются нетоксичными, водорастворимыми, не подавляют пролиферацию клеток в дозах выше терапевтических.

[Библиография](#)[Реферат](#)[Формула](#)[Рисунок](#)[Предыдущий документ](#)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
ДОКУМЕНТ
Бо́льшее количество в конец
в корзину
печать
ход

Предыдущий документ

Библиография Реферат Описание Рисунок

№2196602. Формула

1. Применение водорастворимых аминокислотных или дипептидных производных фуллерена общей формулы

 $C_{60}-X$,где C_{60} -фуллереновое ядро, $X = \text{NH-CHR-COOH, NH-(CH}_2\text{)}_n\text{COOH, NH-CHR-CO-NH-CHR-COOH;}$ $n = 2 - 6;$

R - боковой радикал аминокислоты или дипептида,

в качестве средства для ингибиования вирусных инфекций, в частности, ВИЧ и ЦМВ - инфекций.

2. Способ ингибиования вирусных инфекций в отношении вирусов семейства Lentiviridae и семейства Herpesviridae, заключающийся в воздействии на инфицированные клеточные культуры *in vitro* средства, по п. 1 эффективной фармацевтической дозой.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что в качестве вируса семейства Lentiviridae используют вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

4. Способ по пп. 2 и 3, отличающийся тем, что в качестве ВИЧ-1 для остро инфицированных клеток используют штамм HIV 899.

5. Способ по пп. 2 и 3, отличающийся тем, что в качестве ВИЧ-1 для

хронически инфицированных клеток используют штамм HT HIV27.

6. Способ по п. 2, отличающийся тем, что в качестве вируса семейства Herpesviridae используют цитомегаловирус (ЦМВ) человека.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что в качестве ЦМВ человека используют референс штамм AD 169.

8. Способ по пп. 2-5, отличающийся тем, что воздействие на инфицированные клеточные культуры осуществляют по механизму ингибирования протеазы (ПВИЧ) и обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ эффективной ингибирующей дозой.

9. Способ по пп. 2, 6 и 7, отличающийся тем, что воздействие на инфицированные клеточные культуры осуществляют по механизму ингибирования позднего структурного белка gB ЦМВ человека.

10. Способ по пп. 2-9, отличающийся тем, что в качестве аминокислотного производного фуллерена используют натриевую соль C₆₀-6-аминокапроновой кислоты.

11. Способ по пп. 2-9, отличающийся тем, что в качестве аминокислотного производного фуллерена используют натриевую соль C₆₀-4-аминомасляной кислоты.

12. Способ по пп. 10 и 11, отличающийся тем, что средство для ингибирования не обладает цитотоксичностью до 160-1500 мкМ, имеет индекс селективности (SI) в пределах 267-2500.

13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что средство для ингибирования вызывает 50%-ное подавление пролиферации ~~популяции промоноцитов и быстро восстанавливающих клеток при концентрации~~

первичных лимфоцитов и быстро делящихся клеток при концентрации 720-830 мкМ.

14. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективная фармацевтическая доза (EB_{50}) составляет для остро ВИЧ-инфицированных клеток ($0,5\pm0,1$) мкМ, для хронически ВИЧ-инфицированных - ($10,5\pm2,1$) мкМ, для ЦМВ-инфицированных - ($2,7\pm0,54$) мкМ.
15. Способ по п. 10, отличающийся тем, что концентрация средства для оказания вирулицидного действия в отношении ВИЧ составляет ($1,0\pm0,2$) мкМ, в отношении ЦМВ- ($10,5\pm2,1$) мкМ.
16. Способ по п. 10, отличающийся тем, что ингибирующая доза (ID_{50}) на активность изолированной протеазы ВИЧ составляет $2,6\cdot10^{-6}$ М и на активность рекомбинантной обратной транскриптазы - $6,2\cdot10^{-6}$ М.
17. Способ по п. 11, отличающийся тем, что средство для ингибирования вызывает 50%-ное подавление пролиферации первичных лимфоцитов и быстро делящихся клеток при концентрации 160-1500 мкМ.
18. Способ по п. 11, отличающийся тем, что эффективная фармацевтическая доза (ED_{50}) составляет для остро ВИЧ-инфицированных клеток ($10\pm2,0$) мкМ, для ЦМВ-инфицированных - ($0,6\pm0,12$) мкМ.
19. Способ по п. 11, отличающийся тем, что концентрация ингибитора для оказания вирулицидного действия в отношении ВИЧ составляет ($18,6\pm3,72$) мкМ, в отношении ЦМВ- ($1,5\pm0,3$) мкМ.
20. Способ по п. 11, отличающийся тем, что ингибирующая доза (ID_{50}) на активность изолированной протеазы ВИЧ составляет $3,54\cdot10^{-8}$ М.

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
ДОКУМЕНТ
в начало ЦР
в конец
в корзину
ПРЕДЫДУЩИЕ ТЕРМИНЫ
предыдущий
следующий

Предыдущий документ

Следующий документ

Библиография

№2196602. Реферат

Изобретение относится к медицине, а именно к этиотропной химиотерапии вирусных инфекций и касается средства для ингибирования ВИЧ и ЦМВ-инфекций и способа их ингибирования. Сущность изобретения включает применение аминокислотных и дипептидных производных фуллерена общей формулы $C_{60}-X$, где C_{60} - фуллереновое ядро, $X=NH-CHR-COOH$, $NH-(CH_2)_n COOH$, $NH-CHR-CO-NH-CHR-COOH$; $n = 2 - 6$; R - боковой радикал природной аминокислоты или дипептида, в качестве средства для ингибирования вирусных инфекций, в частности ВИЧ и ЦМВ-инфекций. Способ использования водорастворимых аминокислотных или дипептидных производных фуллерена общей формулы $C_{60}-X$ в качестве средства для ингибирования вирусных инфекций заключается в его воздействии на инфицированные клеточные культуры *in vitro* эффективной ингибирующей дозой. Преимущество изобретения заключается в повышении ингибирующей активности. 2 с. и 18 з.п. ф-лы, 1 табл.

Библиография

Предыдущий документ

Следующий документ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.